

« М.А. Гендельманның 110 жылдығына арналған «Сейфуллин окулары – 19» халықаралық ғылыми-практикалық конференциясының материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 19», посвященной 110 - летию М.А. Гендельмана» - 2023.- Т.І, Ч.ІІ.- С.230-232.

УДК 57.083.3

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ С МАРКЕРАМИ

*Токушев А.А. магистрант I курса
Казахский агротехнический исследовательский
университет им. С.Сейфуллина, г. Астана*

Иммунохроматографический тест (ИХА) используется для экспресс-диагностики и обнаружения чужеродных антигенов и молекул в биологическом материале и зарекомендовал себя как специфичный и чувствительный метод. ИХА находит широкое применение в медицине, ветеринарии, а также в сферах по производству сельскохозяйственной и пищевой продукции [1,2,3,4].

Потребность производства ИХА тестов обусловлено тем, что они могут вооружить медицинских и ветеринарных врачей быстрыми, точными и доступными методами диагностики инфекционных болезней человека и животных, а также обеспечить контроль качества сельскохозяйственной и пищевой продукции.

Согласно совместному докладу ВОЗ, ООН и МЭБ за 2019 год, инфекционные заболевания вызванные устойчивостью к антимикробным препаратам и антибиотикам, могут стать причиной 10 млн. смертей каждый год по всему миру и потерей экономического объема производства на сумму более 100 трлн. долларов к 2050 году. Кроме того, тестирование на наличие токсинов, и различных загрязняющих веществ может предотвратить возникновение новых проблем для здоровья населения в мире [5,6].

Среди всех иммунохимических тестов, ИХА относится к наиболее удобным и распространенным методам, так как не требует специальных навыков и знаний, он может быть выполнен в полевых условиях [7].

В основе ИХА-теста используются три типа антител: конъюгат, который представляет из себя подвижные моноклональные (МКА) или поликлональные антитела (ПКА) к исследуемому антигену сшитые с меткой – коллоидное золото (КЗ), антитела к исследуемому антигену, иммобилизованные в аналитической зоне и вторичные антитела (антивидовые) иммобилизованные в контрольной зоне [8].

Целью наших исследований является определение оптимальных условий для получения конъюгатов специфических антител с маркерами, которые могут быть использованы для конструирования ИХА-тестов для экспресс-обнаружения антигенов *Campylobacter jejuni*.

Материалы и методы исследований. Поликлональные антитела полученные к эпитомам рекомбинантного белка внешней мембраны *Campylobacter jejuni* MOMP32, золотохлороводородная кислота HAuCl_4 (Sigma USA), цитрат натрия (Sigma USA), дистиллированная вода, 1% BSA, Tris HCl (Thermo Scientific).

В качестве метки для специфических антител использовали коллоидное золото, синтез которого проводили по методу Френса [9].

Конъюгирование специфических поликлональных антител с наночастицами золота проводили путем проведения последовательных этапов.

1. В пробирку вносили раствор коллоидного золота, рН раствора доводили до значения 9,5;

1. К коллоидному раствору добавляли специфическими антителами. Сыворотка добавляется каждую минуту и объем общего раствора доводится до определенного значения;

2. Блокировка. В пробирку с раствором наливается BSA 1% + HCl в зависимости от объема исходного раствора. Сыворотка с коллоидным золотом оставляется на блокировку на 30 мин;

3. Полученный конъюгат центрифугировали 20-30 мин при 10000-12000 оборотов в минуту.

С целью определения оптимальных условий получения конъюгатов специфических антител с меткой были осуществлены попытки получения раствора коллоидного золота (20нм) и его конъюгирования со специфическими антителами при разных условиях (таблица 1).

Таблица 1 – Условия получения коллоидного золота и конъюгирования с антителами

Вариант эксперимента	Результат
Отсутствие вторичной стерилизации царской водкой	Коллоидный раствор приобретает красный цвет
Увеличение концентрации ЗХВК до 0,02-0,03%	Коллоидный раствор приобретает насыщенный красный цвет
Увеличение концентрации цитрата натрия до 1,5-2%	Коллоидный раствор приобретает бледный винный цвет
Уменьшение концентрации цитрата натрия до 0,5%	Коллоидный раствор приобретает насыщенный красный цвет
Снижение показателей рН ниже 9,5	Раствор становится слишком кислотным из-за чего невозможна блокировка конъюгата

В результате проведения различных вариантов эксперимента, были определены оптимальные концентрации и значения рН для получения конъюгатов специфических антител с маркерами.

Отработана методика получения коллоидного золота из золотохлороводородной кислоты. Получены два образца коллоидного золота с размером наночастиц 20 и 60 нм, наибольшей активностью обладает коллоидное золото с размером частиц 20 нм. Эти наночастицы коллоидного золота были использованы в дальнейшей работе.

Оптимальные параметры получения конъюгированных препаратов КЗ и специфических антител были следующими: концентрация антител 10-16 мкг/мл, объем 3 мл, рН буфера 6,5. При тестирование конъюгата приготовленного по данной методике была выявлена его высокую активность и чувствительность (2,5 мкг/мл).

Для изучения активности полученных конъюгатов, проводили тестирование в dot- варианте ИФА. Постановку ИФА проводили по следующей методике: на полоски нитроцеллюлозной мембраны наносили микропипеткой по 1 мкл антигена в концентрации (40 мкг/мл, 20 мкг/мл, 10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 1,2 мкг/мл, 0,6 мкг/мл, 0,3 мкг/мл). После полного высыхания антигена, проводили блокировку свободных участков 0,1% BSA. Отмывку проводили трехкратно PBS×1 с Tween20, затем полоски помещали в пробирку с конъюгатами и инкубировали 30 минут при комнатной температуре.

Для обнаружения антигена нитроцеллюлозные полоски помещали в чашки Петри и инкубировали в растворе конъюгата, рН 8,2. Взаимодействие конъюгата с антигеном, наблюдали в виде точек розового цвета в местах специфического взаимодействия через 3-5 мин. Интенсивность окрашивания постепенно усиливалась в течение 1 часа. Чувствительность конъюгата в dot- варианте ИФА составила около 2,5 мкг/мл.

В результате проведенных исследований установили, что методика получения КЗ пригодна для приготовления специфических конъюгатов, а оптимизация условий конъюгирования позволят получить конъюгаты, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью по отношению к АГ.

Таким образом, конъюгат, приготовленный по предложенной методике может быть использован при конструировании ИХА тестов.

Список литературы

- 1 Abolqassem Z.M. Preparation and evaluation of a lateral flow immunochromatographic nanogold diagnostic kit for brucellosis in sheep [Текст]/ Abolqassem Z.M., Ibrahim H.M., Sayed R.H., Sobhy H.M., and Hekal S.H.A. //Veterinary World, -2022-15(11)-P.- 2658–2664;
- 2 Xing, G. New Advances in Lateral Flow Immunoassay (LFI) Technology for Food Safety Detection[Текст]/ Xing, G.; Sun, X.; Li, N.; Li, X.;Wu, T.;Wang, F.// Molecules -2022, -27,P.- 6596.
- 3 Liu, Y. Design of a Signal-Amplified Aptamer-Based Lateral Flow Test Strip for the Rapid Detection of Ochratoxin A in

Red Wine[Text]/ Liu, Y.; Liu, D.; Cui, S.; Li, C.; Yuan, Z.; Zhang, J.; Sun, F. //Foods -2022, -11, P.-1598.

4 Xu B., Tang H. Development and evaluation of time-resolved fluorescent immunochromatographic assay for quantitative detection of SARS-CoV-2 spike antigen[Text]/ Xu B., Tang H., Wang Y., et al.// J Clin Lab Anal. -2022-36 -P.-24513.

5 Sofie Larsson. Production loss and sick leave caused by antibiotic resistance: a register-based cohort study[Text]/Sofie Larsson, Mikael Svensson, Anders Ternhag// BMC Public Health - 2022, -22-P.-527

6 Lade, H.; Joo, H.-S.; Kim, J.-S. Molecular Basis of Non- β -Lactam Antibiotics Resistance in Staphylococcus aureus [Text]/ Lade, H.; Joo, H.-S.; Kim, J.-S.//Antibiotics 2022, 11,-P.- 1378.

7 Benjamin L. Sievers, James Klotzle and Tipu V. Khan. Evaluation of feasibility and user acceptance of lateral-flow self-testing for viral illness in a residential treatment rehabilitation facility[Text]/ Benjamin L. Sievers, James Klotzle and Tipu V. Khan.// Health and Justice -2022, 11-P.-10.

8 Tel OY, Erdenlig Gürbilek S, Keskin O, Güllü Yüce-tepe A, Karadenizli A: Development of lateral flow test for serological diagnosis of tularemia [Text]/Tel OY, Erdenlig Gürbilek S, Keskin O, Güllü Yüce-tepe A, Karadenizli A// Kafkaas Univ Vet Fak Derg,- 2022,28 (5). P-579-58.

9. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions[Text]/ Nature Physical Science, Vol. 241, No. 105, 1973, pp. 20-22.